

ANTITUMOR AGENT

Patent Number: JP60149520
Publication date: 1985-08-07
Inventor(s): MORIOKA HAJIME; others: 04
Applicant(s):: AJINOMOTO KK
Requested Patent: ☐ JP60149520
Application Number: JP19840004400 19840113
Priority Number(s):
IPC Classification: A61K31/16
EC Classification:
Equivalents: JP1756009C, JP4047648B

Abstract

PURPOSE:To provide an antitumor agent containing trichostatin A as an active component.
CONSTITUTION:Trichostatin A of formula obtained by the cultivation of a trichostatin A-producing microbial strain belonging to Streptomyces genus (e.g. Streptomyces sioyaensis FERM-P No.7296) is used as an active component of the present antitumor agent. It has been found newly that the compound has strong effect to inhibit the growth of the mouse erythrocyte Friend cell transformed with Friend virus, mouse fibroblast cell M-MSV Balb3T3 transformed by the Moloney's strain of Murine sarcoma virus, HeLa cell of human cervical carcinoma cell, human leukemia cell, HL-60 cell and ML-1 cell. Dose: 1-2,000mg daily divided in several doses of 0.2-500mg each.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A) 昭60-149520

⑬ Int. Cl.⁴
A 61 K 31/16
// C 07 C 101/453

識別記号 庁内整理番号
ADU 7330-4C

⑭ 公開 昭和60年(1985)8月7日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 抗腫瘍剤

⑯ 特 願 昭59-4400

⑰ 出 願 昭59(1984)1月13日

⑱ 発 明 者	森 岡 一	川崎市幸区鹿島田958
⑱ 発 明 者	武 沢 美 佐 子	横浜市戸塚区和泉町7317-16
⑱ 発 明 者	柴 井 博 四 郎	茅ヶ崎市若松町14-15
⑱ 発 明 者	石 原 勝	横浜市戸塚区和泉町7323-6
⑱ 発 明 者	木 田 隆 夫	横須賀市湘南鷹取3-3-9
⑲ 出 願 人	味の素株式会社	東京都中央区京橋1丁目5番8号

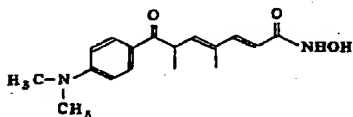
明 細 書

1 発 明 の 名 称

抗腫瘍剤

2 特 許 請 求 の 範 囲

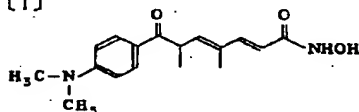
下記構造式で示される物質を含有する抗腫瘍剤



3 発 明 の 詳 細 な 説 明

本発明は新規抗腫瘍剤、より詳しくは下記構造式〔1〕で示されるトリコスタチンAを有効成分として含有する抗腫瘍剤に関する。

〔1〕



トリコスタチンA

これまでトリコスタチンAが抗腫瘍活性を示すことは知られていなかったが、本発明者は、トリコスタチンAが、フレンドウィルス (Friend virus) でトランスフォームしたマウス赤芽球細胞 Friend 細胞、ムリンザルコーマウィルス (Murine Sarcoma virus) のモロニー株 (Moloney) でトランスフォームしたマウスの線維芽細胞 M-MSV-Balb 3T3、ヒト子宮頸癌細胞ヘラ (HeLa) 細胞、ヒト白血病細胞、HL-60 細胞および ML-1 細胞に対し強い生育阻害作用を有していることを初めて見出し、この発見に基づき本発明を完成するに至った。

前記構造式〔1〕で示されるトリコスタチンAは特に Friend 細胞、M-MSV-Balb 3T3 細胞、HeLa 細胞、HL-60 細胞及び ML-1 細胞に対して強い生育阻害作用を有しており、抗腫瘍剤として利用できるものである。

前記構造式で示されるトリコスタチンAは本発明者が見出した方法で製造することができる。すなわち本発明において使用する微生物は、トリコスタチンAを生産する能力を有する微生物であ

り、具体的には土壌中より分離された微生物が使用される。本微生物をパーシーズ・マニュアル・オブ・ディタミネイティブ・バクテリオロジー 8 版 (1974) に従って同定したところストレプトミセス・シオイアエンシス FERM-P-7296 と同定した。

本発明においては上記菌株およびその人工ならびに自然変異体は勿論のこと、ストレプトマイセス属に属するトリコスタチン A 生産菌のすべてが使用され得る。

本微生物を用いてトリコスタチン A を生産するにあたって用いられる培地は炭素源、窒素源及び無機塩類、更に必要に応じて有機微量栄養素を適宜含有する通常の液体培地が用いられる。

炭素源としては、例えばグルコース、フラクトース、マルトース、シュークロース、スターチ、デキストリン、澱粉加水分解物、乳糖等の炭水化物、クエン酸、コハク酸、フマル酸、酢酸等の有機酸類及びグリセリン等のアルコール類が用いられる。窒素源としては例えば硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝

酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム等の硝酸塩、尿素、アンモニア水、アンモニアガス、アミノ酸類、さらにペプトン、大豆ホエー、大豆フレーク及びそれらの加水分解物等の蛋白質、米糠等が用いられる。その他無機塩としては例えばマンガニン、リン酸塩が適宜用いられ、又有機微量栄養素としてはアミノ酸、ビタミン及びこれらを含むペプトン、酵母エキス等が適宜用いられる。培養条件は、培地組成その他により異なるが、例えば通常 pH 4.0~9.0、温度 15~40℃ で振盪培養、通気攪拌培養等好気的条件下に培養が行われる。

本発明のトリコスタチン A はこのようにして培養して得られる培養液中及び菌体内に存在し、培養液よりトリコスタチン A を分離・採取する方法は酢酸エチル等の有機溶媒抽出法、順相及び逆相シリカゲル、セルロース等の吸着剤を用いる吸着クロマトグラフィー、グルコース法、各種溶媒に対する溶解度の差を利用する方法等の公知の分離・

精製法を適宜組み合わせて行われる。一方、菌体内に生成されたトリコスタチン A はクロロホルム等の有機溶媒で抽出した後上記の方法に従って精製分離される。

次に製造例を示す。

第 1 表に示した培地 (pH 7.2) 100 ml を分注した 500 ml 培地フラスコを 120℃ 20 分間殺菌して、これにストレプトミセス・シオイアエンシス FERM-P-7296 の培養液 1 ml を接種し、27℃ で 4 日間培養した。一方 30 l 容のステンレス・ジャーメンターの中に前記の培地を 18 l 入れ殺菌したものの上に上記の種母 2 l を接種しかく拌 (350 rpm)、通気 (1/2 vvm) し 27℃ で 3 日間培養を続けた。更にその 20 l を 2 次種母として 300 l 容のステンレスタンクの中に上記組成の培地 280 l を入れ殺菌したものへ接種しかく拌 (310 rpm)、通気 (1/2 vvm) し、27℃ で 3 日間培養した。

第 1 表

グルコース	1.0	%
酵母エキス	0.2	%
KH ₂ PO ₄	0.1	%
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1	%
ペプトン	0.7	%
ペプトン	0.5	%
デンプン	2.0	%
アデカノール	0.05	%
(pH 7.2)		

280 l の培養液を遠心分離し、菌糸 1.3 kg と除菌液 260 l を得た。菌糸よりトリコスタチン A を含む区分を取得するには、以下の方法に従えばよい。

この菌糸 1.3 kg に、クロロホルム：メタノール (1:1) の混合液 60 l を加え室温で 4 時間攪拌した後、ろ過により菌糸を除去した。濾液を含むクロロホルム-メタノール混合液を濃縮し、油状物質を得た。

除菌液 260 l 中よりトリコスタチン A を含む

区分を取得するには以下の方法に従えばよい。

吸着クロマトグラフィーカラム(オルガノ社製「アンパーライトXAD-7」)(15^{cm}×67^{cm})に該除菌液250^{ml}を注ぎ込み、吸着クロマトグラフィーカラムに吸着しない物質を除去した。その後、吸着クロマトグラフィーカラムに100^{ml}メタノール75^{ml}を注ぎ込み100^{ml}メタノールで溶離されるトリコスタテンAを含む溶液を採取した。該区分をエバポレーターを用い常温で濃縮し、3.1^{ml}の濃縮液を得た。菌糸をクロロホルム-メタノール抽出して得られた油状物質と除菌液中の吸着クロマトグラフィーカラムに吸着される物質で100^{ml}メタノールに溶離される区分については、以下に述べる共通のトリコスタテンAの単離精製工程を用いることができる。

以下、除菌液より得たトリコスタテンAを含む濃縮液中からのトリコスタテンAの単離精製工程について説明する。

上記濃縮液3.1^{ml}に酢酸エチル6^{ml}を加え常温で20分間激しく振盪後静置し、酢酸エチル区分5^{ml}を分取した。次いで残液中に酢酸エチルを6^{ml}加え、再び常温で20分間激しく振盪後静置し、酢酸エチル区分5^{ml}を分取した。これら酢酸エチル区分を合せた後に、エバポレーターを用い常温下で酢酸エチル区分を濃縮・乾固した。この濃縮・乾固した^{トリコスタテンA}を含む区分を100^{ml}メタノール200^{ml}に溶解させた。次にグルイ過クロマトグラフィー(「LH-20」ファルマシヤ社製)カラム(30^{cm}×800^{cm})に上記^{トリコスタテンA}を含む100^{ml}メタノール液を注いだ後、新たに100^{ml}メタノールを30^{ml}注ぎ、グルイ過を行ない、伊液を各々100^{ml}毎に分取した。これらの伊液中からフレンド白血病細胞に対して生育阻害作用を有する画分1^{ml}を採取した。この画分を濃縮後、酢酸エチルとメタノールの混合溶液(7.5:1)10^{ml}に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行なう。酢酸エチル・メタノール(7.5:1)で展開後フレンド白血病細胞に対して生育阻害作用を有する画分100^{ml}を採取した。この画分を濃縮し約500^{mg}のトリコスタテンAの粗物

質を得た。さらにこの粗物質をシリカゲルの薄層クロマトグラフィーで分離精製しトリコスタテンA約200^{mg}を得た。

トリコスタテンAの物理化学的性状は以下の通りである。この性状から本物質は拉、ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス19,1(1979)(J. Antibiotics, N. Tsuboi et al 19,1(1976))の報告するトリコスタテンAと同一であると確認できる。

①融点 m.p. 150~151^{°C}

②分子量 302 (FD-MASS法による)

③元素分析 C, 67.28%, H, 7.40%, N, 9.43%,

④紫外線吸収スペクトル

$\lambda_{\text{EtOH}}^{\text{max}}$ 253 nm, 267 nm, 341 nm

⑤溶剤に対する溶解性

クロロホルム、酢酸エチル、アセトン、ベンゼンに可溶、水に不溶

⑥呈色反応

ドラゲンドルフ反応 陽性

⑦¹H-NMRスペクトラム

第1図参照

⑧¹³C-NMRスペクトラム

第2図参照

次にトリコスタテンAの抗腫瘍活性を示す

(1) Friend細胞に対する生育阻害効果

Ham's F-12粉末培地(Gibco社製の細胞培養用培地成分)10.4^g及びNaHCO₃1.4^gを1.0^lの蒸留水に溶解し、ポアサイズ0.22^μのミリポアフィルターで無菌伊過し、これに無菌的に調製した牛胎児血清(Flow labo社製)を100^{ml}添加して細胞培養用培地を調製した。この培地に、予め培養したフレンド白血病細胞(井川祥二、代誌、15, 145(1978)参照)を加え(細胞濃度:1×10⁴/^{ml})、この細胞懸濁液をマイクロテストプレート(Nunc社製、96穴)に0.1^{ml}宛無菌的に分注し、炭酸ガスインキュベーター中(炭酸ガス濃度5%, 温度37^{°C})で24時間培養した。この培養液に、ストレプトミセス・シオイ・アエンシスFERM-P-7296の発酵液より単離・精製されたトリコスタテンAを一定量含有する上記培地を0.1^{ml}宛添加し、更に

3日間培養を継続し、(トリパンブルーを用いる細胞染色法により生細胞数を計測し)トリコスタテンAのフレンド白血病細胞に対する生育阻害作用を調べた。その結果を第2表に示す。尚、表中(-)は生育阻害のないことを示し(+++)は全ての細胞が死滅することを示す。

第2表 トリコスタテンAの細胞生育阻害効果

濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	フレンド白血病細胞 トリコスタテンA
0	-
0.5	+++
2.5	+++
10.0	+++

第2表より明らかに、トリコスタテンAはフレンド白血病細胞に対して顕著な細胞生育阻害効果を示し、フレンド白血病細胞に細胞毒性を示すことが明らかになった。

(2) M-MSV Balb 3T3 細胞に対する効果

次に、M-MSV ウイルスでトランスフォームした

特開昭60-149520(4)

Balb 3T3 細胞 (Aaronson and Rowe, Virology,

42, 9 (1970) 参照) に対する生育阻害度を第3表に示す。この実験では培地として MEM ダルベッコ培地 (Gibco 社製) を用いた。

結果は第3表に示した。なお、表中の(-)は生育阻害がないことを示し、(+++)はすべての細胞が死滅することを示す。

第3表

濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	M-MSV-Balb 3T3 細胞 トリコスタテンA
0	-
0.5	+++
2.5	+++
10.0	+++

第3表より明らかなごとく、トリコスタテンAはM-MSV-Balb 3T3細胞に対し顕著な細胞生育阻害効果を示し、M-MSV-Balb 3T3細胞に細胞毒性を示すことが明らかになった。

(3) ヒト子宮頸癌細胞 HeLa に対する作用

MEM ダルベッコ粉末培地 (Gibco 社製) 1g を 100ml の二段蒸留水に溶解した後、0.14g の NaHCO_3 を加え溶解し、ミリポアフィルター (0.22 μ) で濾過し、これに牛胎児血清 (Flow Lab. 社製) 1.1ml を加えた培地に、予め、37℃ 5% CO_2 存在下3日間培養した HeLa 細胞 (Gey, Kubicek and Coffman Cancer Res. 12, 264 (1952)) を 5×10^4 cells/ml になる様に分散させ、その培地 0.2ml ずつマイクロプレート (Nunc 社製 96穴) に分注し、3時間5% CO_2 存在下37℃で培養した。これに0~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になる様にトリコスタテンAを5日間培養した。その後生育量をトリパンブルー染色法により生存細胞を計測して求めた。第4表より明らかなごとく、トリコスタテンAはHeLa細胞に対して顕著な細胞生育阻害効果を示し、HeLa細胞に細胞毒性を示すことが明らかになった。したがってトリコスタテンAはHeLa細胞に対し、細胞毒性を与えることがわかる。

第4表

濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	HeLa 細胞 トリコスタテンA
0	-
0.14	+
0.44	++
1.38	+++
8.75	+++

細胞生育阻止効果	++++	完全に細胞死滅
判定基準	+++	生育量は無添加の20%以下
	++	生育量は無添加の20~50%
	+	生育量は無添加の50~90%
	-	生育量は無添加と同じ

(4) ヒト白血病細胞 HL-60, ML-1 に対する作用

RPMI-1640 粉末培地 (Gibco 社製) 1g を 100ml の二段蒸留水に溶解した後、0.14g の NaHCO_3 を加え溶解し、ミリポアフィルター (0.22 μ) で濾過し、これに牛胎児血清 (Flow Lab. 社製) 1.1ml を加えた培地に、予め37℃、5% CO_2 存在下で

3日間培養したHL-60細胞(Collins, et al, Nature, 270, 347-349(1977))およびML-1細胞(J. Minowada et al, International Symposium on New Trends in Human Immunology and Cancer Immunotherapy pp188-199(1980))をそれぞれ 5×10^4 cells/mlになるように分散させその培地0.2mlずつマイクロプレート(Nunc社製96穴)に分注し、3時間5%CO₂存在下37℃で培養した。これに0~500 μg/mlの濃度になるようにトリコスタテンAを添加し5日間培養した。その後生育量をトリパンブルー染色法により生存細胞を計測して求めた。第4表に示す基準により細胞生育阻害度を示したのが第5表である。

第 5 表		
細胞	濃度 (μg/ml)	トリコスタテンA
HL-60	0	-
	0.63	+
	1.89	++
	5.80	+++
	16.50	+++

ことができる。本発明に使用する前記有効成分はかかる治療を必要とする患者(動物およびヒト)に対して患者当たり0.2~500mgの用量範囲で一般に数回に分けて従って1日当たり1~2000mgの全日用量で投与することができる。用量は病気の重さ、患者の体重および当薬者が認める他の因子によって変化する。

本発明に使用する前記物質は生理学的に認められるベヒクル、担体、賦形剤、結合剤、防腐剤、安定剤、香味剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和される。これらの組成物または製剤における活性物質の量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる具体的な薬剤は次に示すものである：トラガント、アラビアゴム、コーンスターチまたはゼラチンのような結合剤；微晶性セルロースのような賦形剤；コーンスターチ、微ゼラチン化デンプン、アルギン酸などのような膨化剤；ステアリン酸マグネシ

特開昭60-149520(5)

ML-1	0	-
	10.0	+
	20.0	++
	39.5	+++
	77.5	+++

第5表から明らかなごとく、トリコスタテンAはHL-60細胞およびML-1細胞に対して顕著な細胞生育阻害効果を示し、HL-60細胞およびML-1細胞に対して細胞毒性を示すことが明らかになった。

以上の結果よりトリコスタテンAは癌細胞の生育を阻害することが明らかになり有効な抗癌剤となり得る。

本発明の構造式(1)で示される物質を有効成分として含有する抗癌剤はヒトに包含される腫瘍哺乳動物を治療する抗癌剤として有用であり、そして経口投与として錠剤、カプセル剤またはエリキシル剤のような調剤または非経口投与として無菌製剤または経腸製剤で処方することによって生体中の腫瘍を抑制せしめるために利用する

ウムのような潤滑剤；シロ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤；ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤、調剤単位形態がカプセルである場合には上記のタイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。種々の他の材料は被覆剤としてまたは調剤単位の物理的形態を別な方法で変化するために存在させることができる。例えば錠剤はシュラック、砂糖またはその両方で被覆することができる。シロップまたはエリキシルは活性化化合物、甘味剤としてシロ糖、防腐剤としてメチルおよびプロピルパラベン、色素およびチェリーまたはオレンジ香味のような香味剤を含有することができる。

注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、ゴマ油、ヤシ油、落花生油、綿実油などのような天然産出植物油またはエチルオレエートなどのような合成脂肪ベヒクルを溶解または懸濁させる通常の製剤実施に従って処方することができる。緩衝剤、防腐剤、酸化防止剤などが必要に応じて結合することができる。

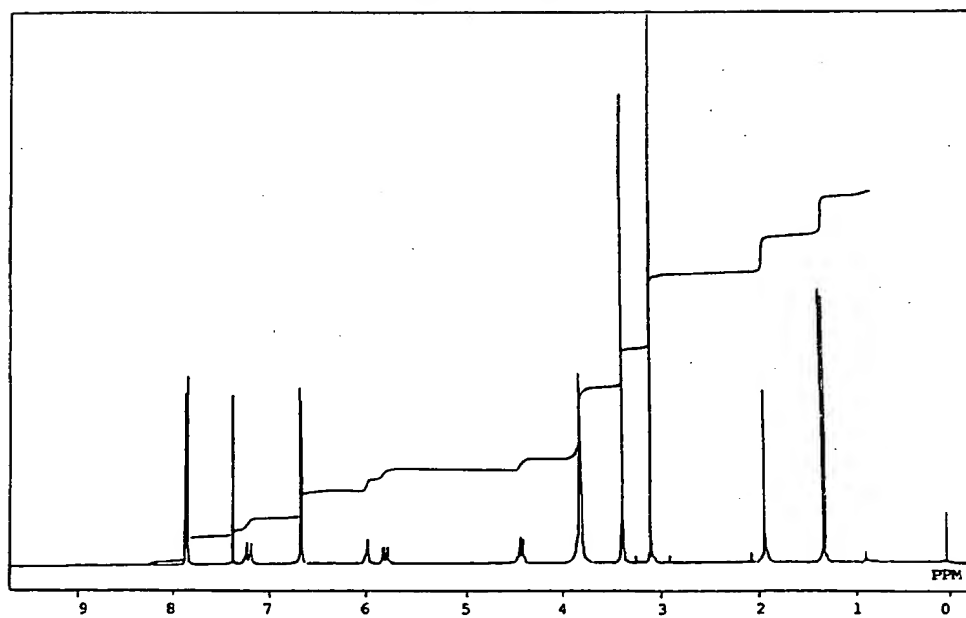
4 図面の簡単な説明

第1図はトリコスタテンAの ^1H -NMRスペクトラムである。

第2図はトリコスタテンAの ^{13}C -NMRスペクトラムである。

出 願 人 味の素株式会社

第 1 図



第 2 図

